

ПРИЧИНЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТОК ПРИ ЗАМОРАЖИВАНИИ-ОТТАИВАНИИ И КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ

Наиболее ранней гипотезой о причинах гибели клеток при замораживании была гипотеза о **механическом** повреждении клеток растущими кристаллами льда. Это предположение казалось очевидным благодаря известной возможности разрыва кристаллизующейся водой пушечных ядер и установленному факту, что объем образующегося льда на 10% превышает исходный объем чистой воды.

Первые успешные попытки по предотвращению криповреждений были сделаны в начале 20 века Н.А.(?)Максимовым, который ставил опыты по защите растительных объектов от «вымерзания» с помощью сахаров и глицерина.

О том, что главную опасность представляет кристаллизация воды, а не охлаждение (и даже не переохлаждение) организма показали опыты (?)Калабухова, который охлаждал летучих мышей и по наличию «температурного скачка» на кривой «температура-время» судил о появлении в теле переохлажденных животных кристаллов льда.

Начиная с 40-х годов 20 столетия процессами кристаллизации водных растворов и клеточных суспензий активно занялась школа американских физиков под руководством В.Luyet. Исследователи на протяжении 30 лет активно использовали методы дифференциального термического анализа, криомикроскопии и электронной микроскопии. В последнем случае замороженные препараты предварительно выдерживали в спирте для замещения им льда. Так удалось получить подтверждение данным световой криомикроскопии о появлении **внутриклеточных кристаллов** при быстром охлаждении. Криомикроскопия продемонстрировала дегидратацию клеток при медленном замораживании и ее отсутствие при быстром с потемнением клеток, интерпретируемым как «рассеяние света мельчайшими кристаллами внутриклеточного льда». Анализ фазовых диаграмм водных растворов позволил авторам искать связь криповреждения с **количеством образующегося льда**.

Успешное применение глицерина для замораживания эритроцитов человека и сперматозоидов животных (?)Смит, Полдж и Паркер, 1949), начавшееся со случайной замены глицерином сахаров в экспериментах по замораживанию, обратило внимание исследователей на такое важное свойство криозащитного вещества, как проницаемость в клетки. Необходимость **присутствия криопротектора в клетке** стала для многих исследователей очевидной.

В 1953÷1955 годах были опубликованы работы J.Lovelock, который обратил внимание на то, что увеличение концентрации криопротектора (глицерина) приводит не только к уменьшению количества образующегося при каждой данной температуре льда, но и концентрации внеклеточной соли (NaCl). Было установлено соответствие между температурами, при которых начинается повреждение эритроцитов и температурами, при которых

достигается концентрация 0,8М NaCl. Автор высказал гипотезу, согласно которой причиной криповреждения при медленном замораживании является лиотропное действие солей, приводящее к нарушению соотношения холестерин/фосфолипиды в плазматической мембране. Гипотеза Лавлока в дальнейшем неоднократно критиковалась в части касающейся причин повреждения мембран, но ее основа – **наличие повреждающего предела внеклеточной концентрации и то, что главным локусом криповреждения является плазматическая мембрана** – нашла отражение в последующем развитии теории криповреждений и криозащиты.

В 60÷70 годы 20 столетия было высказано наибольшее число гипотез о причинах криповреждения клеток.

J.Levitt обратил внимание, что замораживание содержащих SH-группы веществ приводит к образованию S-S-сшивок. В результате была выдвинута следующая гипотеза: понижение температуры приводит к обратимой денатурации белков, а сближение льдом денатурированных молекул сопровождается их необратимой агрегацией. Сначала речь шла о нарушениях в цитоплазме клеток, затем автор пересмотрел свою концепцию и предположил возможность **образования S-S-сшивок** в мембранной структуре. Такие сшивки по мнению автора могли быть причиной **нарушений мембранной проницаемости**. Гипотеза об образовании необратимых сшивок в мембране дальнейшего развития, однако, не получила.

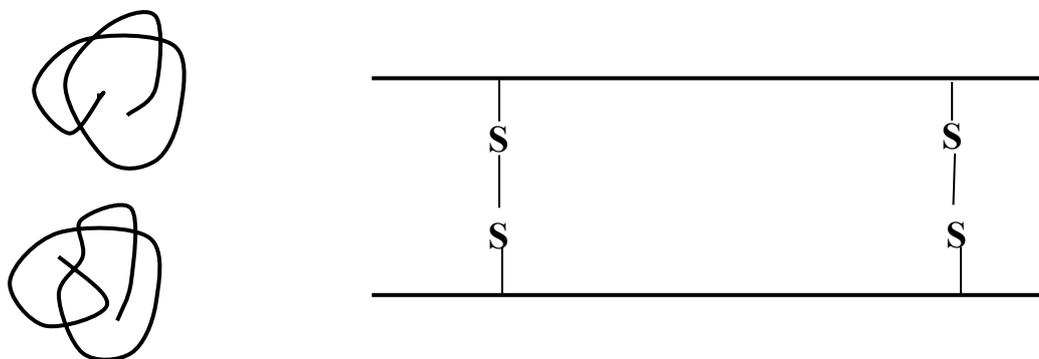


Рис.1 Схема денатурации и агрегации белковых молекул по Левиту

Н.Т.Меруман обратил внимание на осмотический эффект внеклеточных солей и на то, что сахара в осмолярности выше 1600мосм повреждает клетки так же как и NaCl в осмолярности выше 1600мосм (0,8М). Повреждающий эффект концентрированных внеклеточных растворов автор связал не с величиной внеклеточной осмолярности, а с достижением клетками **минимального объема** и происходящим после этого ростом градиента осмотического давления на мембране, компенсируемого ростом градиента гидростатического давления. Механизм повреждения рассматривался автором как состоящий из двух стадий: 1) на этапе замораживания увеличивается проницаемость клеточной мембраны для концентрированного внеклеточного раствора, а 2) на этапе отогрева

эритроциты, оказываясь в среде с более низкой тоничностью, чем их содержимое, набухают; их мембрана растягивается до образования макропор, через которые происходит потеря клетками гемоглобина во внеклеточную среду.

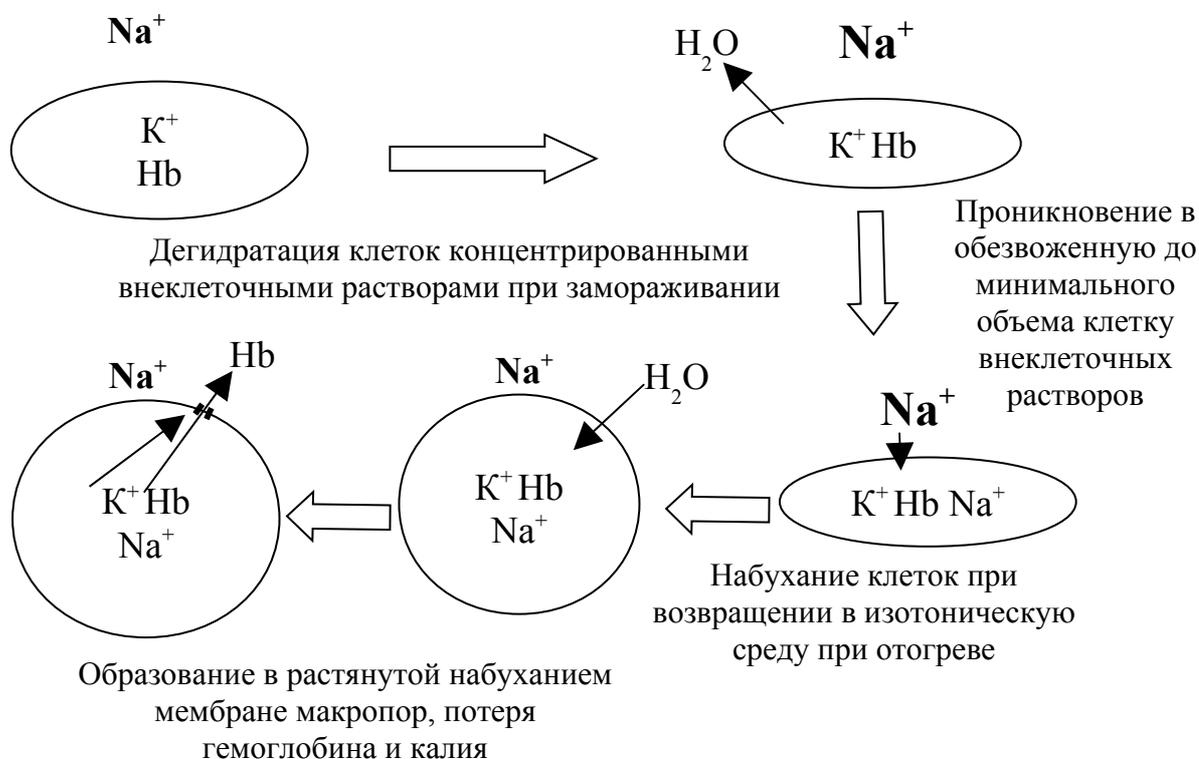


Рис.2 Иллюстрация гипотезы Меримена

J.Farrant и J.Morris выразили сомнение, что нарушения мембранной проницаемости для внеклеточных ионов происходит в результате роста осмотического градиента на мембране сопротивляющейся сжатию клетки. Они предполагали, что сжатая при замораживании клетка теряет часть мембранного материала. При отогреве восстановление исходного клеточного объема, согласно их гипотезе, должно сопровождаться образованием в мембране дефектов.

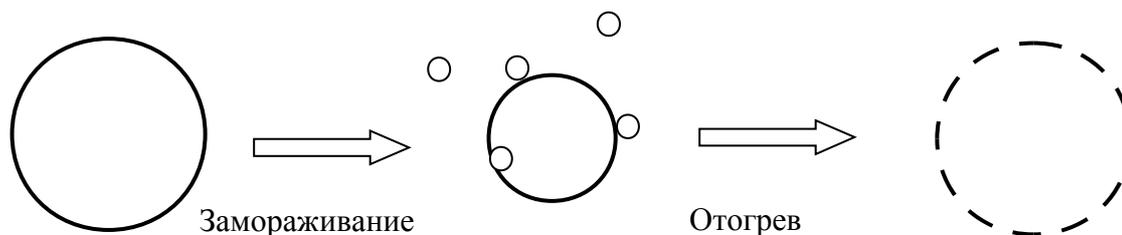


Рис.3 Иллюстрация гипотезы J.Farrant и J.Morris

Дальнейшее развитие теории криповреждения и криозащиты в работах сотрудников Института криобиологии и криомедицины НАН Украины показало, что разрушение клеток может происходить как на этапе отогрева, так и на этапе замораживания. Основные причины гибели клеток при замораживании: **гипертонический лизис** и **гипертонический лизис при охлаждении (криогемолиз)**. При отогреве клетки гибнут в результате **постгипертонического лизиса**, механизм которого близок к предлагаемому в работах Меримена и Фарранта.

Гипертонический лизис

При достаточно медленном охлаждении под криомикроскопом можно наблюдать как клетки в каналах между кристаллами льда после сжатия начинают набухать до размеров, значительно превышающих исходные. Подобным образом они себя ведут в гипертонических средах высокой осмолярности. Причиной набухания клеток в гипертонической среде может быть резкое повышение проницаемости плазматических мембран для внеклеточных растворов, приводящее к исчезновению их концентрационных (и следовательно, осмотических) градиентов на мембране. В результате начинает действовать механизм, известный как «коллоидно-осмотический лизис».

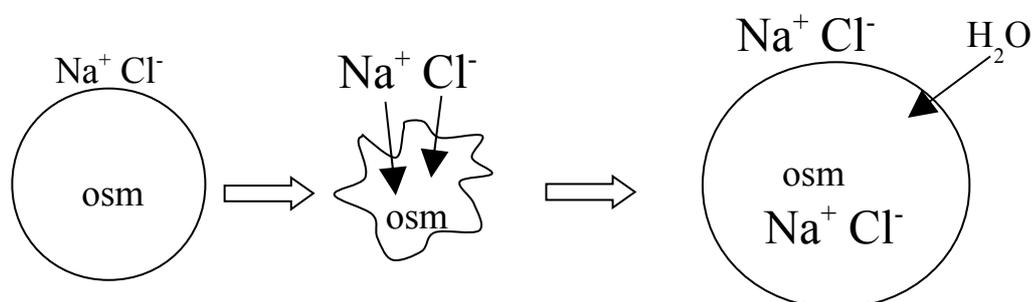


Рис.4 Схема гипертонического лизиса

Гипертонический лизис при охлаждении (криогемолиз, температурный шок)

В гипертонических средах умеренно высоких концентраций (~1,4М) гемолиза эритроцитов человека не отмечается. Но клетки приобретают чувствительность к быстрому охлаждению. В течение экспозиции в гипертонической среде чувствительность эритроцитов к охлаждению падает, но возрастает гемолиз при возвращении клеток в изотоническую среду. Гемолиз эритроцитов при их охлаждении в гипертонических средах получил название «криогемолиз». Не только эритроциты, но и другие клетки (сперматозоиды, эмбрионы, гранулоциты) приобретают чувствительность к быстрому охлаждению в гипертонических средах. Ранее это явление изучали

под названием «температурный шок». Основные закономерности температурного шока сформулированы в 1968г. Ф.И.Осташко применительно к сперматозоидам быка. Автор определил «температурный шок» как явление повреждения клеток при быстром охлаждении в зоне положительных температур и отмечал, что чувствительностью шоку обладают также клетки высших растений и бактерии в логарифмической стадии роста. По-видимому, дегидратация не всегда является необходимым условием проявления повреждающего действия быстрого охлаждения. Закономерности температурного шока:

- 1) повреждение и гибель клеток имеют место только при быстром снижении температуры, медленное охлаждение в том же температурном диапазоне для клеток не опасно;
- 2) при заданной скорости охлаждения существует некоторый минимальный температурный диапазон, внутри которого шок не проявляется, но увеличение диапазона приводит к гибели клеток;
- 3) быстрое нагревание в том же диапазоне температур менее опасно для клеток, чем быстрое охлаждение;
- 4) сверхбыстрое охлаждение к шоку не приводит.

Ф.И.Осташко объяснял повреждение сперматозоидов при быстром охлаждении возникновением на плазматической мембране температурного градиента из-за ее плохой теплопроводности. Возникновение температурного градиента предполагало возникновение осмотического градиента на мембране, приводящего к нарушению мембранной проницаемости ($\Delta\pi = R\Delta T$). Гипотеза Ф.И.Осташко, казалось бы, объясняет закономерности шока, но сравнительно простая оценка показывает, что вклад температурного градиента в перепад осмотического давления на мембране чрезвычайно мал. Понижение температуры на 10 градусов уменьшает осмотическое давление на 0,123 атм. (для сравнения: повышение концентрации на 1М повышает его на 22,4 атм., $R=0,08257 \text{ л} \cdot \text{атм.}/\text{моль} \cdot \text{град.}$).

Температурный (точнее: температурно-осмотический) шок эритроцитов получил название криогемолиза. Закономерности криогемолиза сформулировали J.Farrant и J.Morris.

1. Криогемолиз имеет место когда концентрация внеклеточного компонента (хлористого натрия, сахарозы) превышает предел 1400мосм.
2. Охлаждение со скоростями от 0,5 до 100 град/мин приводит к тем более выраженному криогемолизу, чем выше скорость охлаждения.
3. При охлаждении эритроцитов со скоростью 60 град/мин от 37 до 12⁰С выхода гемоглобина не обнаруживается, снижение нижнего температурного предела до 0⁰С приводит к росту гемолиза. Снижение верхнего предела до 19-20⁰С его предотвращает.
4. Увеличение скорости охлаждения с 0,33 град/мин до 39 град/мин сопровождается увеличением массы внутриклеточной воды с 1,08 до 1,43 (относительно контроля).

5. Подвергнутые криогемолизу эритроциты теряют K^+ , гемоглобин, включают C^{14} -сахарозу.
6. Выход из мембран фосфолипидов и холестерина является следствием, а не причиной криогемолиза.

Е.А.Гордиенко с соавторами (1996÷1998) объяснили явление криогемолиза следующим образом. Дегидратация эритроцитов в гипертонической среде приводит к деформации клеточной мембраны изгибом. Сохранению деформированного состояния способствует повышенная вязкость концентрированного раствора гемоглобина, препятствующая изменению формы внутриклеточного содержимого. Деформация мембраны инициирует латеральное перераспределение мембранных компонентов. Образующиеся мембраной зоны отрицательной и положительной кривизны заполняются молекулами соответствующей (кривизне монослоев) формы. Сепарация мембранных компонентов благоприятствует температурозависимым фазовым перестройкам в деформированных участках мембраны. Эти перестройки сопровождаются локальными уменьшениями площади поверхности мембраны и изотропным натяжением ее участков с образованием в них макроскопических пор (рис.5).

Схема моделирования криогемолиза обычно включает экспозицию эритроцитов в гипертонической среде с температурой $37^{\circ}C$ с последующим

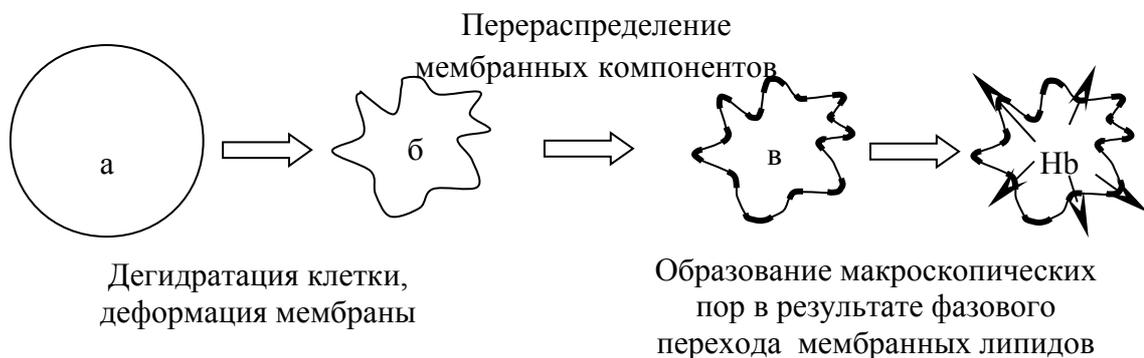


Рис. 5 Схема гипертонаического криогемолиза

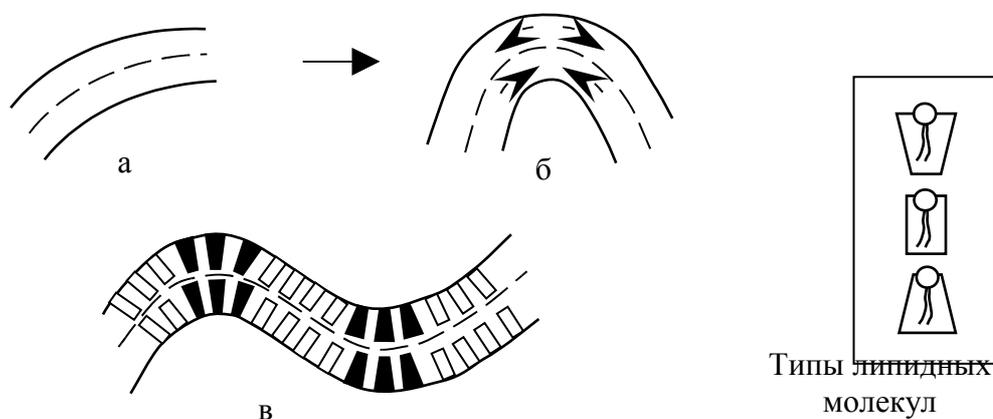


Рис.5а Перераспределение мембранных компонентов при дегидратации

быстрым охлаждением до 0°C . Время экспозиции в гипертонической среде перед охлаждением существенно влияет на криогемолиз. Первые минуты экспозиции в 1,2М растворе NaCl приводят к возрастанию уровня криогемолиза. Это связано с необходимостью перераспределения мембранных компонентов в мембране для образования мембранной поры (индуцируемого температурозависимыми перестройками). В результате пролонгирования экспозиции с 10 мин до 1,5 часов уровень гемолиза снижается от 50% до 10%. Это можно объяснить проникновением в клетки внеклеточных растворов и сопровождающей это проникновение регидратацией эритроцитов, снижающей уровень деформации клеточных мембран

Постгипертонический лизис

Постгипертонический лизис является следствием переноса насыщенных гипертоническими растворами клеток в среду меньшей тоничности. Постгипертонический лизис может иметь место как в процессе оттаивания замороженных суспензий клеток, так и в процессе их отмывания от проникающего криопротектора. Причиной постгипертонического лизиса при отогреве является проникновение в клетки концентрируемых замораживанием внеклеточных солей. До сих пор неясно является это проникновение следствием образования мембранных дефектов или нормальной объем-регулирующей реакцией. Уровень гемолиза эритроцитов, после экспозиции в условиях умеренной гипертонии ($\sim 1,2\div 1,5\text{M}$) и возвращения в изотоническую среду возрастает с увеличением времени

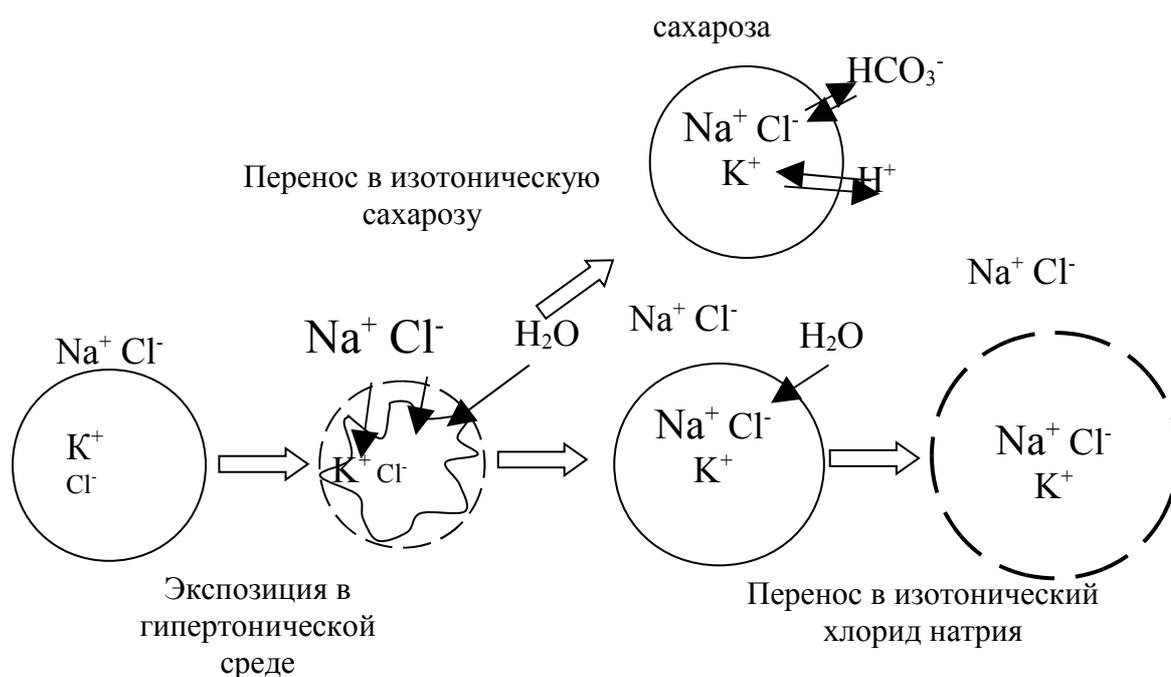


Рис.6 Схема инициации и развития постгипертонического лизиса в растворах хлористого натрия и его предотвращения в растворе сахарозы.

нахождения в гипертонической среде. Частичную защиту от постгипертонического лизиса может обеспечить быстрый выход из клеток анионов хлора, осуществляемый в обмен на входящие в клетку анионы OH^- (HCO_3^-). Условием такого выхода является создание направленного наружу градиента анионов Cl^- на мембране. Этом быстрый обмен может сопровождаться более медленным обменом внутриклеточного K^+ на H^+ .

Постгипертонический лизис при возвращении насыщенных криопротектором клеток в изотоническую среду - результат чрезмерного увеличения клеточного объема при действии больших осмотических градиентов на мембране. Чем больше концентрационный градиент на мембране и меньше проницаемость криопротектора, тем больше возрастает клеточный объем на стадии отмывания от криопротектора в результате компенсирующего осмотический градиент движения воды в клетку. По мере выхода из клетки криопротектора по градиенту его концентрации осмотическое давление внутриклеточного содержимого снижается, и избыточная вода покидает клетку (рис.7).

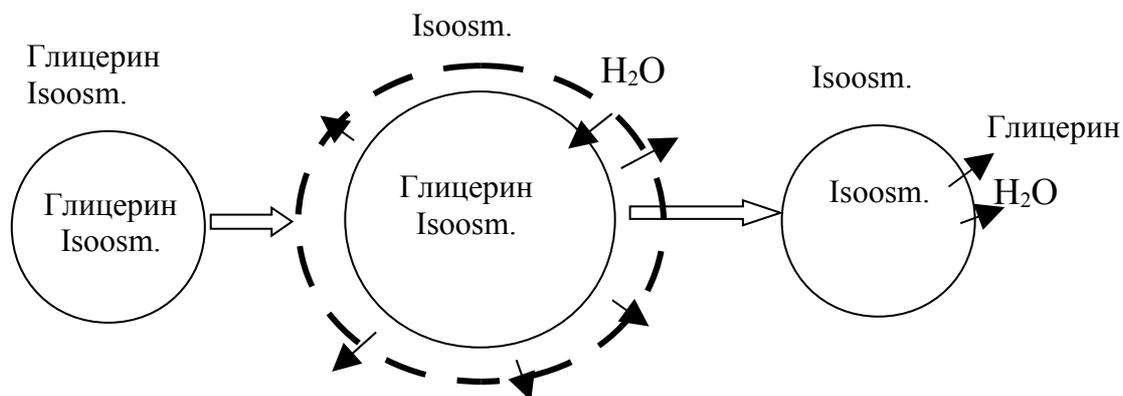


Рис.7 Изменения клеточного объема при удалении криопротектора из клетки

Таким образом, зоной первичных повреждений при замораживании-оттаивании и криоконсервировании клеток принято считать клеточную мембрану. Причиной гибели клеток при криоконсервировании может стать **образование макроскопических пор** с последующим выходом из клеток крупных молекул или поступление в клетку внеклеточных осмолитов, нарушающее осмотическое равновесие на мембране и приводящее к набуханию клетки. Набухание может завершаться образованием макроскопических пор, однако это не единственная причина разрушения клеточной структуры. Возможно, что чрезмерное **оводнение** (особенно это касается более сложно организованных, чем эритроцит, клеток) представляет опасность как явление приводящее к дезорганизации внутриклеточной структуры и большинства клеточных процессов. Поступление в клетки концентрированных внеклеточных растворов также может представлять серьезную опасность. Так Асахина показал, что **проникновение** в яйцеклетки морского ежа **концентрированных растворов** хлористого

натрия приводит к изменениям в цитоплазме клеток, определяемым как «черный цитолиз».

В работах некоторых авторов (Т.Nei, Р.Mazur) особое внимание уделялось «незамороженной фракции» раствора. Было показано, что криоповреждение в большей мере коррелирует с объемом незамороженной фракции, чем с концентрацией внеклеточной соли. Эти данные не противоречат, однако, общей концепции, т.к. способствующие увеличению этой незамороженной фракции криопротекторы сами могут вносить вклад в осмотическое повреждение.

Сохранность замороженных клеток может зависеть и от структуры образующегося льда. При образовании крупнокристаллических структур происходит концентрирование клеток в каналах между кристаллами льда. Тесный контакт клеток может стать причиной их агрегации.

К сожалению, причины повреждения клеток при быстром замораживании (ив частности ,внутриклеточным льдом) до сих пор остаются неясными. Многие исследователи обращали внимание на возможность развития деструктивных изменений в клетках благодаря «денатурирующему» действию дегидратации макромолекул. В настоящее время, однако, экспериментальная основа для утверждения такой концепции отсутствует. Изменение активности и структуры белков-ферментов происходит только после многократно повторяемых циклов медленного замораживания-оттаивания. Гипотезу Мазура о деструктивном действии прорастания внеклеточного льда внутрь клетки по водным порам вряд ли можно признать конструктивной. В отношении причин нарушения мембранной проницаемости при быстром замораживании высказывались и другие гипотезы, не получившие, к сожалению, серьезного экспериментально-теоретического обоснования. В частности, Степонкус (1984) предполагал, что прочиной нарушения мембранной проницаемости при замораживании может стать диэлектрический пробой, индуцируемый электрическими полями в замораживаемых растворах, возникающими в результате разделения зарядов при кристаллизации.